

21

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055692 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11,
A61K 31/713, C12N 15/88, A61P 35/00

91054 Erlangen (DE). SCHUPPAN, Detlef [DE/DE];
Baumzeit 2, 91088 Bubenreuth (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00151

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 a,
91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Januar 2002 (09.01.2002)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 00 586.5 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Universitätsstrasse
30, 95447 Bayreuth (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREUTZER, Roland
[DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).
LIMMER, Stefan [DE/DE]; Universitätsstrasse 30,
95447 Bayreuth (DE). VORNLOCHER, Hans-Peter
[DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).
HADWIGER, Philipp [DE/DE]; Universitätsstrasse
30, 95447 Bayreuth (DE). GEICK, Anke [DE/DE];
Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). OCKER,
Matthias [DE/DE]; Beethovenstr. 15, 91052 Erlangen
(DE). HEROLD, Christoph [DE/DE]; Spardofer Str. 40,

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE AND MEDICAMENT FOR TREATING A
TUMOR DISEASE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES ZIELGENS UND MEDIKAMENT ZUR THE-
RAPIE EINER TUMORERKRANKUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for inhibiting an expression of at least one target gene that impedes or prevents the
apoptosis of a tumor cell, whereby at least one double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the tumor cell whose
strand S1 has a region, which is complementary to the target gene at least in areas and which is comprised of fewer than 25 consecutive
nucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung einer die Apoptose einer Tumorzelle hemmenden
oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in
die Tumorzelle eingeführt wird, deren einer Strang S1 einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus weniger
als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist.

WO 02/055692 A2

Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens und Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression mindestens eines Zielgens in einer Zelle sowie ein Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung.

Aus der WO 99/32619 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens mittels einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid bekannt. Das bekannte Verfahren zielt auf die Hemmung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 25 Basen aufweist.

Ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle sowie ein Medikament sind aus der WO 00/44895 bekannt. Bei dem Verfahren wird ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) in die Zelle eingeführt. Ein Strang der dsRNA weist einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren bestehenden Bereich auf. Das Medikament enthält mindestens eine dsRNA zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementär ist.

Aus Gautschi O. et al. (2001), J Natl Cancer Inst 93, Seiten 463 bis 471 ist es bekannt, daß eine erhöhte Expression der anti-apoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2 und Bcl-xL an der Entwicklung und dem Fortschreiten vieler Tumore beteiligt ist. In Nacktmäusen erzeugte in vivo-Daten belegen, daß mit einer kombinierten Behandlung mit gegen die Expression von Bcl-2- und Bcl-xL-Genen gerichteten einzelsträngigen Anti-

sinn-Oligonukleotiden ein Wachstum von Tumoren um etwa 50 bis 60% verringert werden konnte. Dazu war eine Behandlung mit 20 mg Oligonukleotiden pro Kilogramm Körpergewicht und Tag erforderlich. Durch diese große Menge erforderlicher Oligonukleotide ist die Behandlung verhältnismäßig teuer. Darüber hinaus können die eingesetzten einzelsträngigen Oligonukleotide schnell im Serum abgebaut werden. Die hohe Oligonukleotidmenge ist erforderlich, weil ein Antisinn-Oligonukleotid letztendlich in einer Menge in Zielzellen eingebracht werden muß, die mindestens genauso groß ist wie die Menge der dort vorhandenen mRNA des Zielgens. Mit dem Verfahren wurde lediglich eine Verringerung des Wachstums, nicht jedoch eine Rückbildung der Tumore erreicht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein Verfahren und ein Medikament angegeben werden, mit dem die Vermehrung von Tumorzellen effektiv und kostengünstig gehemmt werden kann.

20

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 13 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 2 bis 12 und 14 bis 26.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Hemmung einer die Apoptose einer Tumorzelle hemmenden oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens vorgesehen, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Tumorzelle eingeführt wird, deren einer Strang S1 einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist. Unter dem "Zielgen" wird der DNA-Strang der doppelsträngigen DNA in der Tumorzelle verstanden, welcher

komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem Zielgen handelt es sich also im allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu
5 einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide
10 der dsRNA müssen Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen das Verfahren kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang. Unter "eingeführt werden" wird das Aufnehmen in die Zelle verstanden. Das Aufnehmen kann durch die Zelle selbst erfolgen. Es kann aber auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden.
15

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß mit diesem Verfahren die Vermehrung von Tumorzellen mit einer erheblich geringeren Menge an Oligoribonukleotiden gehemmt werden kann, als Oligonukleotide zum Erzielen eines vergleichbaren Ergebnisses bei der herkömmlichen Antisinn-Technik erforderlich sind. Darüber hinaus ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, in einer Population von Tumorzellen in einem
20 solchen Ausmaß Apoptosen auszulösen, daß nicht nur das Wachstum der Population, sondern die Gesamtzahl der Tumorzellen verringert wird. Bei Durchführung des Verfahrens mit normalen, d.h. nicht transformierten, Zellen bewirkt das Verfahren
25 gegenüber einem mit einer Kontroll-dsRNA durchgeführten Verfahren keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate. Die Kontroll-dsRNA ist eine dsRNA, welche keinen zu einem in den Zellen vorkommenden Gen komplementären Strang aufweist.
30

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des Zielgens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet..

Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Verfahrens. In einem Ausführungsbeispiel weist die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Eine solche dsRNA hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blutserum als besonders beständig erwiesen.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, vorzugsweise 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des Zielgens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide

ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare.

Mindestens ein Ende der dsRNA kann modifiziert werden, um einem Abbau in der Tumorzelle oder einer Dissoziation der doppelsträngigen Struktur entgegenzuwirken. Weiterhin kann der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht werden. Die chemische Verknüpfung kann durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet werden. Sie kann auch durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist das Zielgen mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL. Es ist auch möglich, daß mehrere Gene Zielgene sind. So können sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL Zielgene sein. Die Hemmung der Gene der Bcl-2-Familie ist besonders günstig, weil deren verstärkte Expression mit der Entwicklung und der Vermehrung vieler Tumorzellen in Zusammenhang steht. Die Hemmung mehrerer Zielgene ist vorteilhaft, weil es Tumorzellen gibt, welche mehrere anti-apoptotisch wirkende Gene exprimieren.

Vorzugsweise besteht die dsRNA aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des Zielgens Bcl-2 besonders wirksam. Bei der

Tumorzelle kann es sich um eine Pankreaskarzinomzelle handeln. Zum Einbringen der dsRNA in die Tumorzelle kann eine die dsRNA umschließende micellare Struktur, vorzugsweise ein Liposom, oder ein die dsRNA umschließendes Kapsid verwendet
5 werden. Das Kapsid kann insbesondere ein virales natürliches Kapsid oder ein auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestelltes künstliches Kapsid oder eine davon abgeleitete Struktur sein.

- 10 Weiterhin betrifft die Erfindung ein Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung, das mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung einer Expression mindestens eines Zielgens enthält, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären
15 aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist. Das Zielgen ist dabei ein Gen, dessen Expression eine Apoptose von Tumorzellen hemmt oder verhindert. Das Medikament ist so zu dosieren, daß die Hemmung der Expression mindestens eines Zielgens erreicht werden kann.
- 20 Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß ein solches Medikament dazu sehr niedrig dosiert eingesetzt werden kann. Eine Dosierung von 5 mg dsRNA pro Kilogramm Körpergewicht und Tag sind ausreichend, um in den Tumorzellen eine Hemmung oder vollständige Unterdrückung der Expression des Zielgens zu er-
25 reichen. Bei einer solch niedrigen Dosierung werden Nebenwirkungen weitgehend ausgeschlossen.

Vorzugsweise weist zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzel-
30 strängigen Überhang auf. Der einzelsträngige Überhang kann sich am 3'-Ende des Strangs S1 befinden. Besonders bevorzugt weist die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang

auf. Es hat sich herausgestellt, daß eine solche dsRNA im Körper besonders beständig ist. Sie wird in Blut langsamer abgebaut bzw. ausgeschieden als eine dsRNA mit einzelsträngigen Überhängen an beiden Enden. Dadurch ist eine niedrige Dosierung möglich.

Der komplementäre Bereich kann 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Der Strang S1 kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Bei einer Ausführungsform ist mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert, um einem Abbau in den Tumorzellen oder einer Dissoziation entgegenzuwirken. Der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur kann durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht sein.

Das Zielgen ist vorzugsweise mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL. Besonders effizient ist ein Medikament, welches eine sowohl für das Zielgen Bcl-2 als auch für das Zielgen Bcl-xL spezifische dsRNA aufweist.

Die dsRNA kann aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll bestehen. Die mit dem Medikament zu behandelnde Tumorerkrankung kann ein Pankreaskarzinom sein. Für das Pankreaskarzinom existiert bislang keine ausreichend erfolgreiche Therapie. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei circa 3% und ist die niedrigste aller Karzinome. Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung oder von einer micellaren Struktur, vor-

zugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegen. Eine micellare Struktur oder ein Kapsid kann die Aufnahme der dsRNA in die Tumorzellen erleichtern. Das Medikament kann eine Zubereitung aufweisen, die zur Inhalation, 5 oralen Aufnahme oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Injektion oder zur Injektion direkt in ein Tumorgewebe, geeignet ist. Eine zur Inhalation oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer 10 phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, daß eine lediglich in einem solchen Puffer gelöst dsRNA von den Tumorzellen aufgenommen wird und die Expression des Zielgens hemmt, ohne daß die dsRNA dazu in ein besonderes Vehikel verpackt werden muß. 15

Nachfolgend werden anhand der Figuren Beispiele der Erfindung erläutert. Es zeigen:

- 20 Fig. 1 die prozentuale Apoptoserate von humanen Pankreaskarzinomzellen YAP C 120 Stunden nach Transfektion mit einer zu einer ersten Sequenz aus dem humanen Bcl-2-Gen komplementären dsRNA 1,
- 25 Fig. 2 die prozentuale Apoptoserate der YAP C-Zellen 120 Stunden nach Transfektion mit einer zu einer zweiten Sequenz aus dem humanen Bcl-2-Gen komplementären dsRNA 2 und
- 30 Fig. 3 die prozentuale Apoptoserate von YAP C-Zellen 120 Stunden nach Transfektion mit einer zu einer Sequenz aus dem Noemycin-Resistenzgen komplementären dsRNA 3.

Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie YAP C, welche unter der Nr. ACC 382 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig bezogen werden können, wurden unter konstanten Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640-Medium (Fa. Biochrom, Berlin) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Humane Hautfibroblasten wurden unter den gleichen Bedingungen in Dulbecco's MEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die für Transfektionen eingesetzten doppelsträngigen Oligoribonukleotide weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:6 bezeichneten, Sequenzen auf:

dsRNA 1, welche zu einer ersten Sequenz aus dem humanen Bcl-2-Gen komplementär ist:

S2: 5'- cag gac cuc gcc gcu gca gac c-3' (SEQ ID NO: 1)
S1: 3'-cg guc cug gag cgg cga cgu cug g-5' (SEQ ID NO: 2)

dsRNA 2, welche zu einer zweiten Sequenz aus dem humanen Bcl-2-Gen komplementär ist:

S2: 5'- g ccu uug ugg aac ugu acg gcc-3' (SEQ ID NO: 3)
S1: 3'-uac gga aac acc uug aca ugc cgg-5' (SEQ ID NO: 4)

dsRNA 3, welche zu einer Sequenz aus dem Neomycin-Resistenz-Gen komplementär ist:

S2: 5'- c aag gau gag gau cgu uuc gca-3' (SEQ ID NO: 5)
S1: 3'-ucu guc cua cuc cua gca aag cg -5' (SEQ ID NO: 6)

Die Transfektionen wurden in einer 6-Well-Platte mit Oligofectamine (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Pro Well wurden 250.000 Zellen ausgesetzt. Die Transfektion der doppelsträngigen Oligoribonukleotide wurde nach dem von Invitrogen für Oligofectamine empfohlenen Protokoll durchgeführt (Angaben beziehen sich auf 1 Well einer 6-Well-Platte):

10 µl des doppelsträngigen Oligoribonukleotids (0,1 - 10 µM) wurden mit 175 µl Zellkulturmedium ohne Zusätze verdünnt. 3 µl Oligofectamine wurden mit 12 µl Zellkulturmedium ohne Zusätze verdünnt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das so verdünnte Oligofectamine wurde zu den bereits verdünnten doppelsträngigen Oligoribonukleotiden gegeben, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit Zellkulturmedium ohne Zusätze gewaschen und 800 µl frisches Zellkulturmedium zugegeben. Danach wurden pro Well 200 µl des beschriebenen Oligofectamine-dsRNA-Gemisches zugegeben, so daß das Endvolumen für die Transfektion 1000 µl betrug. Hierdurch ergibt sich eine Endkonzentration der doppelsträngigen Oligoribonukleotide von 1-100 µM. Der Transfektionsansatz wurde vier Stunden bei 37°C bebrütet. Danach wurden pro Well 500 µl Zellkulturmedium mit 30% FKS zugegeben, so daß die Endkonzentration an FKS 10% betrug. Dieser Ansatz wurde für 120 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Überstände gesammelt, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und 10 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit hypotoner Propidiumjodidlösung 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte durchflußzytometrisch in dem Fluores-

zenz-unterstützten Zellsortierer FACSCalibur (Fa. BD GmbH, Heidelberg).

Die doppelsträngigen Oligoribonukleotide dsRNA 1 und dsRNA 2
5 verringern die durch Bcl-2 vermittelte Hemmung der Apoptose
in den untersuchten humanen Pankreaskarzinomzellen. Zur Aus-
lösung bzw. Einleitung der Apoptose ist keine zusätzliche
Stimulation der Apoptose erforderlich. Die Apoptoserate stieg
in Abhängigkeit von der Inkubationszeit an. Fig. 1 zeigt das
10 mit der dsRNA 1 und Fig. 2 das mit der dsRNA 2 erzielte Er-
gebnis. Während unbehandelte YAP C-Kontrollzellen und Zellen,
mit welchen das beschriebene Verfahren zur Transfektion ohne
doppelsträngiges Oligoribonukleotid durchgeführt wurde (mock-
transfizierte Zellen), nur 3,8% und 7,1% Apoptose nach 120
15 Stunden Inkubation aufwiesen, konnte durch Transfektion mit
100 nM dsRNA die Apoptoserate nach 120 Stunden auf 37,2% bei
Transfektion mit dsRNA 1 und 28,9% bei Transfektion mit dsRNA
2 gesteigert werden. Die Kontrolltransfektion mit der dsRNA 3
führte zu einer maximalen Apoptoserate von 13,5%. Das stellt
20 keine signifikante Steigerung gegenüber den mocktransfizier-
ten Zellen dar und belegt die Sequenzspezifität der Wirkung
der dsRNAs 1 und 2.

Zur Kontrolle wurden auch Hautfibroblasten als nicht trans-
25 formierte Zellen mit den dsRNAs 1 und 2 transfiziert. Diese
Zellen zeigten nach 120 Stunden keinen signifikantes Anstei-
gen der Apoptoserate.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung einer die Apoptose einer Tumorzelle hemmenden oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Tumorzelle eingeführt wird, deren einer Strang S1 einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert wird, um einem Abbau in der Tumorzelle oder einer Dissoziation entgegenzuwirken.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der dsRNA durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
- 5 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL, ist oder sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL Zielgene sind.
- 10 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
- 15 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Tumorzelle eine Pankreaskarzinomzelle ist.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA mittels einer die dsRNA umschließenden micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder eines die dsRNA umschließenden Kapsids, in die Tumorzelle eingebracht wird.
- 20 13. Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung enthaltend mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung einer die Apoptose von Tumorzellen hemmenden oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist.
- 25

14. Medikament nach Anspruch 13, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
15. Medikament nach Anspruch 13 oder 14, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
16. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 15, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
17. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
18. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.
19. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in den Tumorzellen oder einer Dissoziation entgegenzuwirken.
20. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der dsRNA durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.
21. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 20, wobei das Zielgen mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL, ist oder sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL Zielgene sind.

22. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 21, wobei die dsRNA aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
23. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei die Tumorerkrankung ein Pankreaskarzinom ist.
24. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 23, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegt.
25. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Injektion oder zur Injektion direkt in ein Tumorgewebe, geeignet ist.
26. Medikament nach Anspruch 25, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

1/3

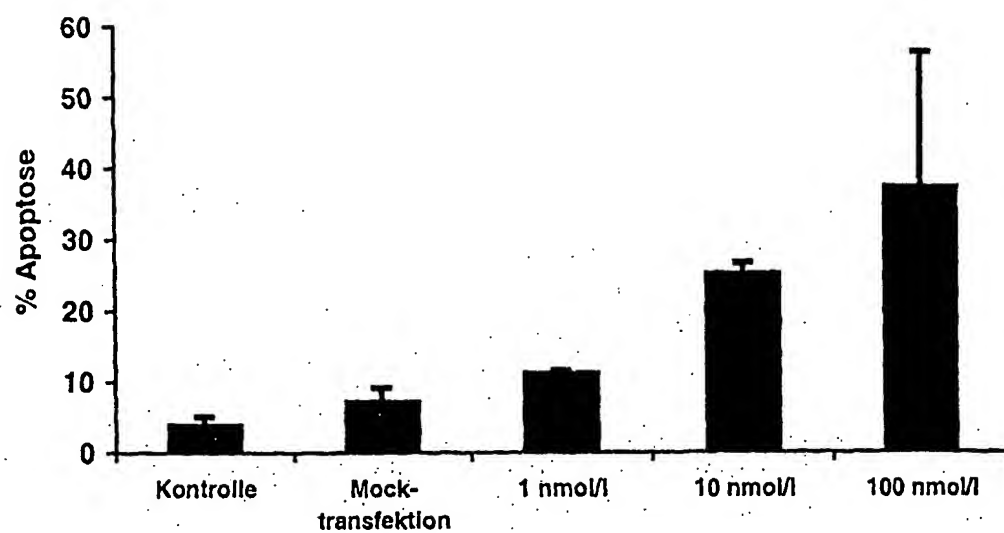


Fig. 1

2/3

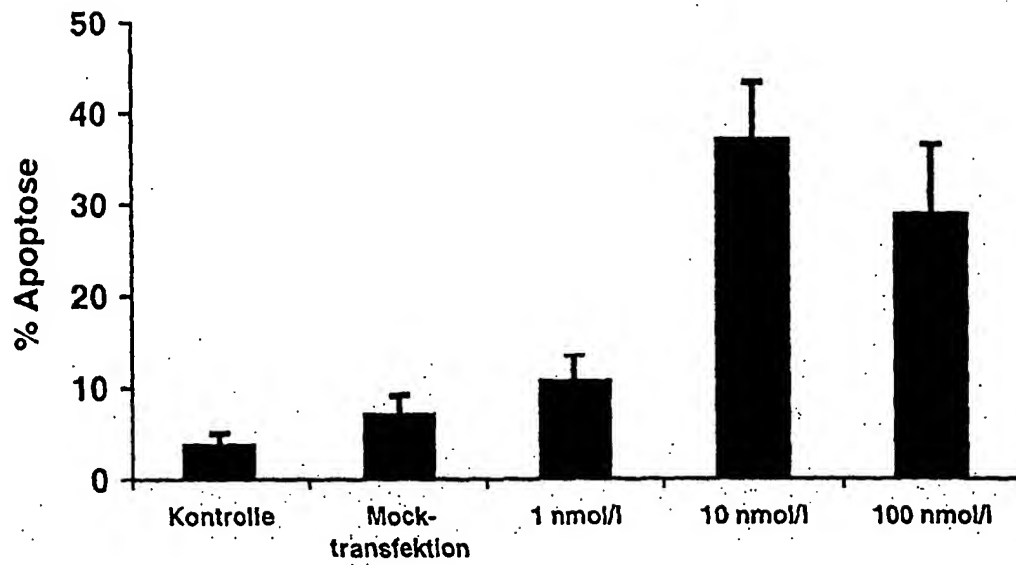


Fig. 2

3/3

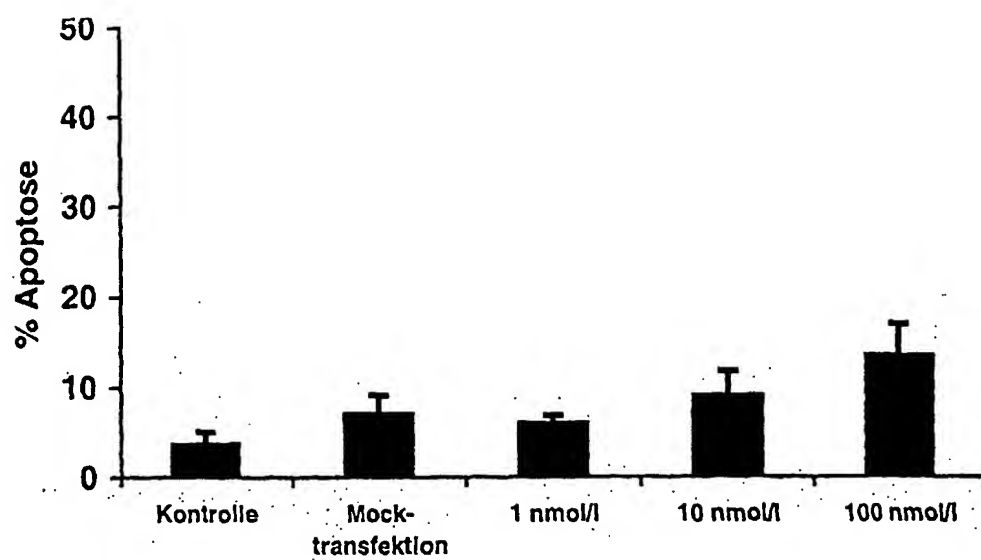


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ribopharma AG

5 <120> Tumormedikament

<130> 412012GA

<140>

10 <141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

20 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang
einer zu einer Sequenz des humanen Bcl-2-Gens
komplementären dsRNA

25 <400> 1

caggaccucg ccgcugcaga cc 22

30 <210> 2

<211> 24

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

35 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des humanen
Bcl-2-Gens komplementären dsRNA

40 <400> 2

ggucugcagc ggcgaggucc uggc 24

<210> 3

45 <211> 22

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang
einer zu einer Sequenz des humanen Bcl-2-Gens
komplementären dsRNA

<400> 3

55 gccuuugugg aacuguacgg cc 22

<210> 4

<211> 24

60 <212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des humanen
Bcl-2-Gens komplementären dsRNA.
5
<400> 4
ggccguacag uuccacaaag gcau 24
10
<210> 5
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
15
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang
einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens
komplementären dsRNA
20
<400> 5
caaggauag gaucguuucg ca 22
25
<210> 6
<211> 23
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
30
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des
Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA
35
<400> 6
gcgaaacgau ccucauccug ucu 23

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055692 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11, A61K 31/713, C12N 15/88, A61P 35/00 (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 a, 91052 Erlangen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00151 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Januar 2002 (09.01.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 00 586.5 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KREUTZER, Roland [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). LIMMER, Stefan [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). VORNLOCHER, Hans-Peter [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). HADWIGER, Philipp [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). GEICK, Anke [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). OCKER, Matthias [DE/DE]; Beethovenstr. 15, 91052 Erlangen (DE). HEROLD, Christoph [DE/DE]; Spardofer Str. 40, 91054 Erlangen (DE). SCHUPPAN, Detlef [DE/DE]; Baumzeit 2, 91088 Bubenreuth (DE).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 12. Juni 2003
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE AND MEDICAMENT FOR TREATING A TUMOR DISEASE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES ZIELGENS UND MEDIKAMENT ZUR THERAPIE EINER TUMORERKRANKUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for inhibiting an expression of at least one target gene that impedes or prevents the apoptosis of a tumor cell, whereby at least one double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the tumor cell whose strand S1 has a region, which is complementary to the target gene at least in areas and which is comprised of fewer than 25 consecutive nucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung einer die Apoptose einer Tumorzelle hemmenden oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Tumorzelle eingeführt wird, deren einer Strang S1 einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist.

WO 02/055692 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/00151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ; JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12 February 1998 (1998-02-12) the whole document	1-26
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ; MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW ()) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document	1-26
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ; LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-26
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ; LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-26
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 January 2003		Date of mailing of the international search report 27/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Armandola, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/00151

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 figure 1	1-26
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document	1-26
Y,P	AMBROS VICTOR: "Dicing up RNAs" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 293, no. 5531, 3 August 2001 (2001-08-03), pages 811-813, XP002183122 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-26
Y,P	GAUTSCHI O., TSCHOPP S., OLIE R.A. ET AL: "Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins." J. NATL. CANCER INST., vol. 93, no. 6, 21 March 2001 (2001-03-21), pages 463-471, XP009003270 cited in the application the whole document	1-26
A	WO 94 01550 A (AGRAWAL SUDHIR ;HYBRIDON INC (US); TANG JIN YAN (US)) 20 January 1994 (1994-01-20)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/00151

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9805770	A	12-02-1998	DE 19631919 A1 WO 9805770 A2 EP 0918853 A2	12-02-1998 12-02-1998 02-06-1999
WO 9932619	A	01-07-1999	AU 743798 B2 AU 1938099 A CA 2311999 A1 EP 1042462 A1 JP 2002516062 T WO 9932619 A1	07-02-2002 12-07-1999 01-07-1999 11-10-2000 04-06-2002 01-07-1999
WO 0044914	A	03-08-2000	AU 2634800 A EP 1147204 A1 WO 0044914 A1 US 2002114784 A1	18-08-2000 24-10-2001 03-08-2000 22-08-2002
WO 0044895	A	03-08-2000	DE 19956568 A1 AT 222953 T AU 3271300 A WO 0044895 A1 DE 10080167 D2 DE 50000414 D1 EP 1144623 A1 EP 1214945 A2	17-08-2000 15-09-2002 18-08-2000 03-08-2000 28-02-2002 02-10-2002 17-10-2001 19-06-2002
WO 9401550	A	20-01-1994	AT 171210 T AU 4770093 A CA 2139319 A1 CZ 9403332 A3 DE 69321122 D1 EP 0649467 A1 FI 946201 A HU 69981 A2 JP 8501928 T NO 945020 A NZ 255028 A PL 307025 A1 WO 9401550 A1	15-10-1998 31-01-1994 20-01-1994 12-07-1995 22-10-1998 26-04-1995 30-12-1994 28-09-1995 05-03-1996 28-02-1995 24-03-1997 02-05-1995 20-01-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/00151

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 A61P35/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ; JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12. Februar 1998 (1998-02-12) das ganze Dokument	1-26
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ; MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW () 1. Juli 1999 (1999-07-01) das ganze Dokument	1-26
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ; LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument	1-26
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ; LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument	1-26
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 8. Januar 2003		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 27/01/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Armandola, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/00151

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 Abbildung 1	1-26
Y	----- ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNA1: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument	1-26
Y,P	----- AMBROS VICTOR: "Dicing up RNAs" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 293, Nr. 5531, 3. August 2001 (2001-08-03), Seiten 811-813, XP002183122 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument	1-26
Y,P	----- GAUTSCHI O., TSCHOPP S., OLIE R.A. ET AL: "Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins." J. NATL. CANCER INST., Bd. 93, Nr. 6, 21. März 2001 (2001-03-21), Seiten 463-471, XP009003270 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-26
A	----- WO 94 01550 A (AGRAWAL SUDHIR ;HYBRIDON INC (US); TANG JIN YAN (US)) 20. Januar 1994 (1994-01-20) -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/00151

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9805770 A	12-02-1998	DE 19631919 A1 WO 9805770 A2 EP 0918853 A2	12-02-1998 12-02-1998 02-06-1999
WO 9932619 A	01-07-1999	AU 743798 B2 AU 1938099 A CA 2311999 A1 EP 1042462 A1 JP 2002516062 T WO 9932619 A1	07-02-2002 12-07-1999 01-07-1999 11-10-2000 04-06-2002 01-07-1999
WO 0044914 A	03-08-2000	AU 2634800 A EP 1147204 A1 WO 0044914 A1 US 2002114784 A1	18-08-2000 24-10-2001 03-08-2000 22-08-2002
WO 0044895 A	03-08-2000	DE 19956568 A1 AT 222953 T AU 3271300 A WO 0044895 A1 DE 10080167 D2 DE 50000414 D1 EP 1144623 A1 EP 1214945 A2	17-08-2000 15-09-2002 18-08-2000 03-08-2000 28-02-2002 02-10-2002 17-10-2001 19-06-2002
WO 9401550 A	20-01-1994	AT 171210 T AU 4770093 A CA 2139319 A1 CZ 9403332 A3 DE 69321122 D1 EP 0649467 A1 FI 946201 A HU 69981 A2 JP 8501928 T NO 945020 A NZ 255028 A PL 307025 A1 WO 9401550 A1	15-10-1998 31-01-1994 20-01-1994 12-07-1995 22-10-1998 26-04-1995 30-12-1994 28-09-1995 05-03-1996 28-02-1995 24-03-1997 02-05-1995 20-01-1994